

# La biopsie de villosités choriales et le diagnostic anténatal

J.B. SAVARY\*,  
F. VASSEUR\*, F. FONTAINE\*  
J.L. LAI\*, C. REGNIER\*\*  
M. COTTEEL\*\*\*, M. DEMINATTI\*

● Le diagnostic prénatal précoce des affections chromosomiques et de certaines affections géniques est réalisé en routine à partir d'une amniocentèse précoce à la 18<sup>e</sup> semaine d'aménorrhée.

● Les progrès techniques, en particulier l'apport de l'échographie, en ont diminué considérablement les risques et les complications, rendant ainsi cette méthode très fiable (à titre indicatif, entre 1980 et 1985 nous avons réalisé 606 diagnostics anténataux sans observer de complications majeures portant atteinte à la mère ou au fœtus).

Depuis 1983, l'analyse des villosités choriales introduite par SIMONI *et coll.* (4) permet un diagnostic prénatal très précoce. En effet, les méthodes classiques cytogénétiques, enzymatiques ou de génétique moléculaire sont adaptables à ce nouveau matériel, le prélèvement étant réalisé à la 9<sup>e</sup> semaine de gestation.

Dans ce travail, nous apportons nos premiers résultats

\* Service de Cytogénétique (Pr. DEMINATTI), Faculté de Médecine, 1 place de Verdun, 59047 Lille Cédex.

\*\* Service de Gynécologie-Obstétrique, (Pr. DELECOUR), Maternité Salengro, Rue Malpart, 59000 Lille.

\*\*\* Clinique Cotteel, 1 rue Hégel, 59000 Lille.

tats obtenus à partir de biopsies de villosités choriales (B.V.C.) et nous discutons de l'intérêt des indications et des limites de cette nouvelle méthode.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les méthodes présentées ici ont été mises au point sur des villosités choriales résultant de produits d'I.V.G., avant d'être appliquées en vue du diagnostic.

### A - MATÉRIEL

Quatre patientes ont bénéficié d'une B.V.C., les motifs de consultation étant :

- patiente n° 1 : antécédent de trisomie 13,
- patiente n° 2 : conductrice de myopathie de DUCHENNE,
- patiente n° 3 : âge maternel,
- patiente n° 4 : irradiation pelvienne pour radio-diagnostic.

Par ailleurs, une grossesse molaire et un œuf clair expulsés à la 10<sup>e</sup> semaine ont été étudiés à partir des villosités choriales. Dans tous les cas, les prélèvements sont acheminés au laboratoire dans du Tyrode stérile, à la température ambiante.

Le repérage des villosités choriales prélevées se fait sous loupe binoculaire. Après une identification rigoureuse, les bouquets villositaires ou les fragments villositaires sont immédiatement isolés (*fig. 1*).

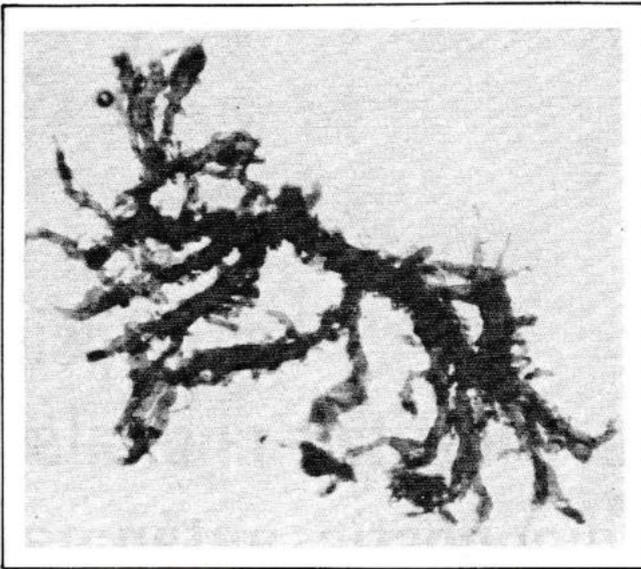


Fig. 1. - Bouquet villositaire.

## B - MÉTHODES

### 1) Méthodes de prélèvement

La technique du prélèvement utilisée est la **biopsie à la pince (par voie transcervicale) sous contrôle échographique**.

- ▶ La patiente ne reçoit qu'une prémédication simple.
- ▶ Dans la majorité des cas, le trophoblaste est facilement accessible, et un prélèvement de bonne qualité est effectué au premier essai.
- ▶ Un petit saignement peut persister le jour de la ponction ou survenir dans un délai de 3 à 4 jours, sans caractère péjoratif.

### 2) Méthodes d'analyse cytogénétique

Un examen direct par étude des mitoses spontanées a été proposé (6) mais compte tenu du faible nombre

de mitoses observées, et d'un marquage chromosomique de moindre qualité, nous préférons réaliser une culture à moyen terme. Les sexes chromatinien X et Y, l'obtention des métaphases et l'identification chromosomique sont réalisées par les techniques classiques (1).

### 3) Étude de l'A.D.N. par enzyme de restriction

Nous disposons dans le Service de la sonde pMLW fournie sous forme de plasmide par le Service de Biochimie C.H.U. Henri Mondor 94010 Créteil (Pr. M. GOOSSENS), qui permet la détection de la mutation  $\beta s$  (2) de la Drépanocytose, sous forme d'une bande d'A.D.N. à 1,4 kb au lieu de 1,2 kb chez le sujet normal. Nous avons hybridé cette sonde moléculaire avec d'une part un A.D.N. chorial extrait de villosités choriales selon la technique de KIRBY (3) que nous avons adaptée, et d'autre part avec de l'A.D.N. leucocytaire. Les A.D.N. sont digérés par l'enzyme de restriction CvnI (BRL). Après électrophorèse sur gel d'agarose, les A.D.N. sont transférés sur filtre de nitrocellulose selon la méthode de SOUTHERN (5) puis hybridés avec la sonde pMLW.

### 4) Dosages enzymatiques

Les bouquets ou fragments villositaires sélectionnés pour l'étude biochimique sont traités de la même façon que les leucocytes sanguins pour doser d'une part par spectrofluorométrie la  $\beta$  galactosidase, l' $\alpha$  galactosidase, la  $\beta$  glucuronidase, la  $\beta$  glucosidase, l' $\alpha$  mannosidase, l' $\alpha$  fucosidase et les hexosaminidases A et B qui sont secondairement isolées par électrophorèse, d'autre part par spectrocolorimétrie les aryl-sulfatases.

## RÉSULTATS

### 1) Résultats cytogénétiques

Le tableau I détaille pour chaque cas, le motif de l'examen, l'âge gestationnel, le nombre de villosités analysées, le nombre de cellules étudiées et le caryotype de l'échantillon. Le délai moyen de résultat est

TABLEAU I  
Analyse des observations

Cas n°	Motif de l'examen	Âge gestationnel (semaines)	Nombre de villosités analysées le caryotype	Nombre de cellules étudiées	Caryotype de l'échantillon	Devenir de la grossesse
1	Antécédent de trisomie 13	8	3	15	47,XY,+13	Fausse couche à 3 jours
2	Conductrice de myopathie	9	1	10	46,XY	Fausse couche à 4 mois
3	Âge maternel	9	2	15	46,XY	Évolutive
4	Irradiation pelvienne	9	3	10	46,XX	Évolutive
5	Oeuf clair	10	5	15	46,XX	-
6	Grossesse molaire	?	5	10	69,XXY	-

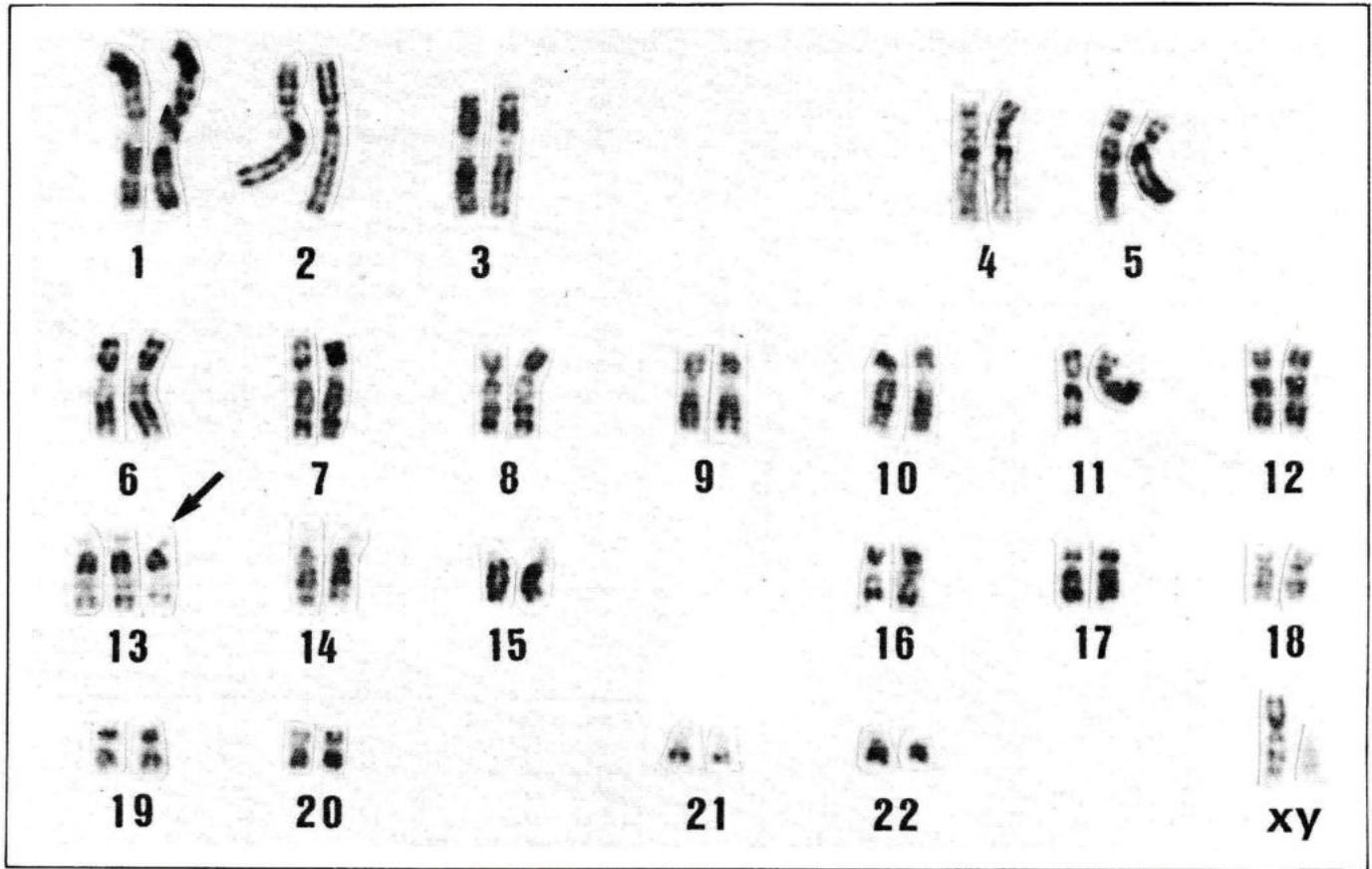


Fig. 2. - Caryotype 47, XY, + 13 (cas n° 1).

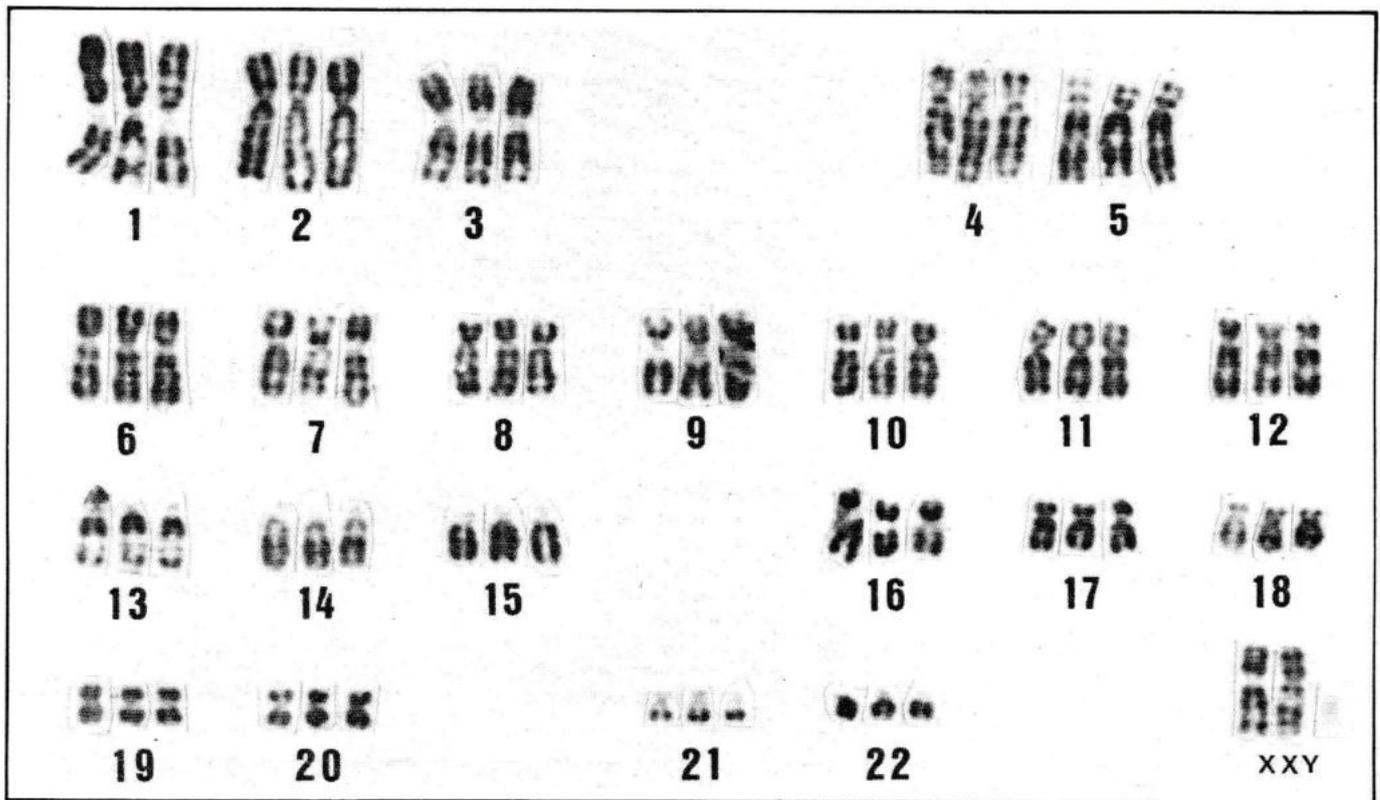


Fig. 3. - Caryotype 69, XXY (cas n° 6).

de 15 jours. Dans tous les cas, un minimum de 10 cellules a été analysé après identification chromosomique en bandes R.

Parmi les quatre patientes ayant bénéficié de la méthode à visée diagnostique, une anomalie chromosomique fœtale a été décelée (cas 1 : trisomie 13) (fig. 2), trois caryotypes se sont avérés normaux (cas 2-3-4). L'étude des deux produits de curetage a

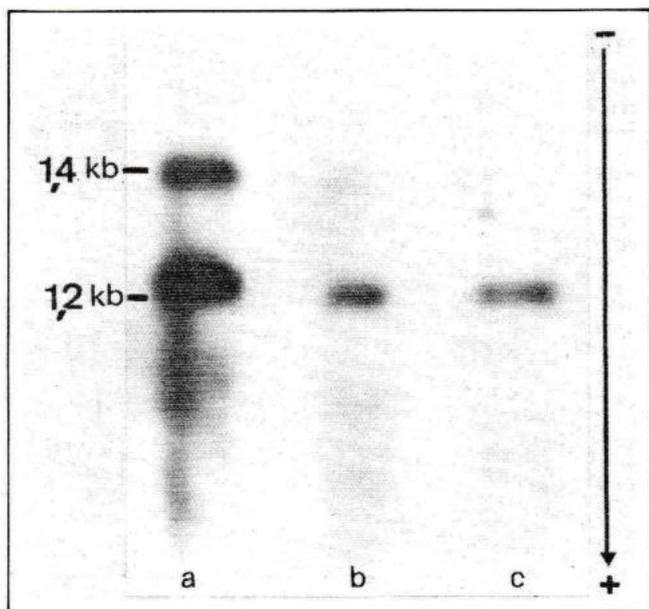


Fig. 4. - Détection de la mutation  $\beta$  S par la sonde pMLW :  
 a : ADN d'un sujet hétérozygote  
 b : ADN leucocytaire d'un sujet normal  
 c : ADN villositaire.

conclu à un caryotype normal dans le cas d'un œuf clair (cas 5) et à une triploïdie dans le cas d'une grossesse molaire (cas 6) (fig. 3).

## 2) Résultats en génétique moléculaire

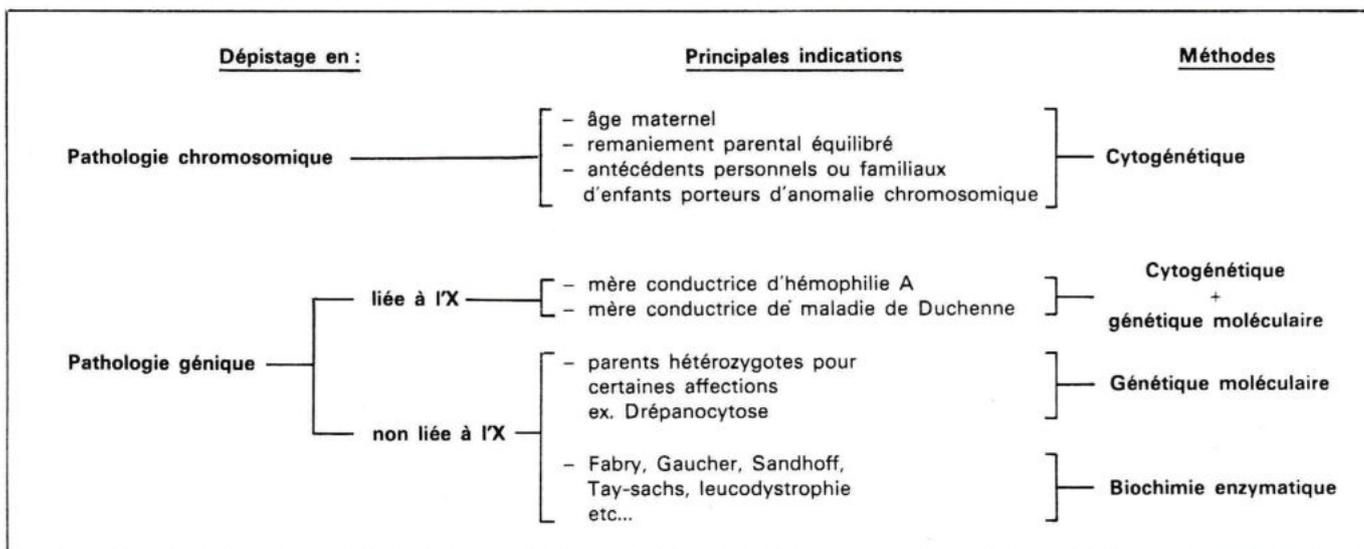
Nous avons hybridé la sonde moléculaire pMLW avec un ADN villositaire, avec un ADN leucocytaire de sujets normaux et avec un ADN leucocytaire de sujets hétérozygotes pour la drépanocytose.

Nous retrouvons une bande d'ADN à 1,2 kb au niveau des ADN villositaire et leucocytaire des sujets normaux. Chez les sujets hétérozygotes, existe une bande supplémentaire de 1,4 kb (fig. 4).

TABLEAU II  
 Mesure des activités enzymatiques

Enzymes	Activité enzymatique (nanomoles/h/mg de protéines)	
	Prélèvement 1	Prélèvement 2
$\beta$ galactosidase	1 610	2 050
$\alpha$ galactosidase	138	146
$\beta$ glucuronidase	254	341
$\beta$ glucosidase	562	476
$\alpha$ fucosidase	-	612
hexoaminidase A+B	-	3 071
pH 3,5	-	119
$\alpha$ mannosidase	pH 4,5	175
A	-	84
arylsulfatase	B	163

TABLEAU III  
 Critères de choix des méthodes  
 de diagnostic anté-natal



Nous disposons, par ailleurs, de la sonde « met » qui nous a été fournie par le Pr. RAY-WHITE (University of Utah) et de la sonde « pJ3-11 » fournie par le Pr. SCHMIDKTE (Göttingen). Ces sondes reconnaissent un polymorphisme de l'A.D.N. proche du locus responsable de la mucoviscidose. La digestion de l'A.D.N. par les enzymes de restriction Msp I ou Taq I suivi d'hybridation avec ces sondes devraient nous permettre dans un proche avenir le diagnostic fœtal dans certaines familles.

### 3) Résultats enzymatiques

Huit activités enzymatiques ont été dosées. Les résultats sont exprimés en nanomoles par heure et par milligramme de protéines (Tableau II).

## DISCUSSION

Deux méthodes sont actuellement proposées pour le diagnostic anténatal, d'une part l'amniocentèse précoce, d'autre part la B.V.C., dont les indications sont théoriquement les mêmes (6) (tableau III). Le choix de la méthode à utiliser, en particulier le choix de la B.V.C., doit tenir compte des avantages et des contraintes de cette technique par rapport à l'amniocentèse.

### 1) Avantage de la B.V.C. par rapport à l'amniocentèse

Malgré l'innocuité de l'amniocentèse précoce, son inconvénient réside dans les délais de résultat imposés d'une part par la date de ponction et d'autre part par le laboratoire, ce qui peut conduire à un stress psychologique important si une interruption de grossesse est décidée par suite d'une anomalie fœtale. Par ailleurs, les avortements thérapeutiques du deuxième trimestre ne sont pas dénués de complications médicales. **La B.V.C. est réalisée à la 9<sup>e</sup> semaine de gestation**, stade où les villosités choriales sont réparties sur le pourtour du zygote, avant de régresser pour ne subsister que dans la région où se localisera le placenta. L'avantage de la B.V.C. est la **précocité du diagnostic** qui permet un gain de temps de deux mois par rapport au délai de résultat qu'impose l'amniocentèse. *Dans ces conditions, en cas d'anomalie fœtale, l'interruption thérapeutique de la grossesse apparaît techniquement plus facile et psychologiquement mieux supportée.*

### 2) Contraintes de la B.V.C.

Les contraintes de la B.V.C. sont liées au matériel prélevé et à la technique de prélèvement.

#### ► Contraintes liées au matériel

● Le premier problème tient à la **qualité du matériel**. En effet, le repérage et l'identification rigoureuse des bouquets et fragments villositaires dans le matériel prélevé sont indispensables afin d'éviter de faux résultats liés à une contamination par un tissu endométrial maternel, quelle que soit l'analyse réalisée. Dans le cadre d'un bilan cytogénétique, il est impératif, pour minimiser ce problème, de **réaliser les sexes chromatiniens X et Y dès réception des prélèvements**. Par ailleurs, le diagnostic peut également être limité par la nature même du tissu prélevé. Il peut, en effet, exister des anomalies choriales anatomo-pathologiques sans anomalie chromosomique.

● Le deuxième problème tient à la **qualité de matériel prélevé**. Si trois bouquets villositaires sont prélevés, les bilans cytogénétique, biochimique et des études de biologie moléculaire peuvent être réalisés simultanément par analyse directe, sans culture préalable.

Néanmoins, un index mitotique initial faible peut limiter le diagnostic cytogénétique. Par ailleurs, dans le cadre d'un diagnostic enzymatique, le problème est de savoir si les enzymes recherchées sont fonctionnelles dans le chorion au moment de la biopsie et si une éventuelle déficience enzymatique peut être mise en évidence.

Si peu de matériel est prélevé (ex. : un bouquet villositaire) la réalisation simultanée de plusieurs analyses nécessite une culture préalable, mais dans ces conditions les résultats biochimiques ne représentent plus l'expression directe de l'activité zygotique.

#### ► Contraintes liées à la technique de prélèvement

Les complications précoces graves de la B.V.C. sont essentiellement représentées par des **métrorragies**, des **hématomes**, des **perforations des membranes zygotiques** ou des **infections intra-utérines**. La prévention de ces complications passe par la dextérité de l'opérateur mais à l'heure actuelle la perte fœtale est estimée à 4,6 % (6). Ce taux élevé doit néanmoins être corrigé car toutes les fausses couches observées ne sont pas dues au prélèvement. En effet, compte tenu de la date de la biopsie, certaines fausses couches sont en rapport avec les différents facteurs (dont les

chromosomiques) responsables des avortements spontanés du premier trimestre.

Pour les auteurs, le **pourcentage réel de fausses couches liées au prélèvement est de 1 à 2 % (6)**. Reste à savoir si ces avortements sont liés à une atteinte fœtale ou à la manipulation de l'utérus.

► *Dans l'observation n° 1*, l'interruption de la grossesse trois jours après le prélèvement est en faveur d'un avortement provoqué par la ponction ; néanmoins, le caryotype fœtal étant déséquilibré, on ne peut exclure l'étiologie chromosomique pour cette fausse couche.

► *Dans l'observation n° 2*, la grossesse s'est interrompue deux mois après la B.V.C., il est peu vraisemblable que le prélèvement soit responsable de la fausse couche compte tenu d'une part du délai entre l'interruption de la grossesse et la date de ponction, et d'autre part du fait de la nature mono-amniotique de cette grossesse gémellaire. On sait, en effet, que ce type de grossesse est exposé à une interruption précoce.

## CONCLUSIONS

Sur le plan pratique, le choix de la B.V.C. par rapport à l'amniocentèse doit mettre en balance les risques techniques et les avantages de la précocité du diagnostic. Actuellement, nous estimons que la B.V.C. peut être envisagée lorsque le risque d'anomalie fœtale est très élevé, c'est-à-dire supérieur ou égal aux risques liés au prélèvement, mais il est sûr que dans le futur, au fur et à mesure de la diminution des risques,

les indications de la B.V.C. s'élargiront et la B.V.C. supplantera l'amniocentèse précoce.

**La biopsie de villosités chorales (B.V.C.) permet un diagnostic anténatal très précoce. Au fur et à mesure que les risques inhérents à la technique diminueront, les indications de la B.V.C. s'élargiront, et la B.V.C. est appelée à supplanter l'amniocentèse précoce.**

## BIBLIOGRAPHIE

1. DUTRILLAUX B., COUTURIER J. – La pratique de l'analyse chromosomique. 1981, ed. Masson, Paris.
2. GOOSSENS M., DUMEZ Y., KAPLAN L., LUPKER M., CHABRET C., HENRION R., ROSA J. – Prenatal diagnosis of sickle cell anemia in the first trimester of pregnancy. *New England J. of Med.*, 1983, 309, 831-833.
3. KIRBY K.S. – A new method for the isolation of nucleic acids from mammalian tissues. *Biochem. J.*, 1956, 64, 405.
4. SIMONI G., BRAMBATI B., DANESINO C., ROSSELLA F., TERZOLI G.L., FERRARI M., FRACCARO M. – Efficient direct chromosome analyses and enzyme determinations from chorionic villi samples in the first trimester of pregnancy. *Human Genetics*, 1983, 63, 349-357.
5. SOUTHERN E.M. – Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 1975, 98, 503.
6. International symposium on first trimester fetal diagnosis. Lausanne Chuv, 1985, november 1-2.

## en direct des laboratoires

### « QUAND LE MUSCLE SE MEURT, QUAND LE MUSCLE EST MORT »

Les Laboratoires BAYER PHARMA ont tenu à s'associer au Professeur CARPENTIER et au Docteur FABIANI dans le cadre d'une Conférence portant sur un thème de grande actualité : La Cardiologie du Futur.

En effet, sauver le muscle en urgence ou le remplacer quand il est détruit, représentent les deux grands axes de la recherche actuelle en cardiologie.

Sauver le myocarde ischémié, c'est tout d'abord une course contre la montre qui doit permettre la désobstruction des coronaires dans les premières heures. C'est également reperfusion dans des conditions précises pour éviter l'aggravation des lésions morphologiques et l'apparition de troubles du rythme.

Quand le muscle est mort, il faut le remplacer par un muscle contractile.

En cas d'atteinte segmentaire, le muscle dorsal peut suppléer à une partie de la fonction (cardiomyoplastie). En cas de défaillance globale, la transplantation cardiaque, opération bien réglée, permet d'obtenir d'excellents résultats grâce à un traitement anti-rejet efficace. Parfois, un état critique et l'absence temporaire de greffon rendent nécessaires l'utilisation d'un cœur artificiel temporaire.

Tous les efforts actuels de recherche mèneront à la mise au point du vrai cœur artificiel, complètement intracorporel, prothèses, moteur et source d'énergie.

Résolument tournés vers l'avenir, les Laboratoires BAYER PHARMA soutiennent le Laboratoire de Recherche sur les Prothèses Cardiaques de l'Hôpital Broussais qui est dirigé par le Professeur CARPENTIER.